



温和提取 · 大质粒完整不断裂

大质粒中量提取试剂盒

Large-Plasmid midi Extraction Kit

适用质粒：Bacmid / BAC / PAC / Fosmid · 高拷贝大质粒 (pUC ori, 15–30 kb) · 低拷贝质粒 (p15A / pSC101) · oriV 诱导型 Fosmid/BAC

文件编号	版本号	生效日期	页码
WD-IFU-NovaBac-MIDI	V1.0	2026 年 08 月 10 日	见页脚

目 录

1	产品简介	1
1.1	产品概述	1
1.2	产品特点	1
1.3	适用范围	1
2	产品货号与组分	1
2.1	用户自备材料与设备	2
2.2	运输与储存	2
3	实验流程概览	2
4	使用前准备	3
5	操作步骤	4
5.1	菌体培养与收集	4
5.2	碱裂解与澄清	4
5.3	层析柱层析	5
5.4	沉淀、洗涤与复溶	5
6	大质粒的结果鉴定建议	5
7	常见问题排查	6

① 阅读提示：本说明书中标注★的步骤为大质粒纯化的关键控制点，直接决定得率与完整性

1 产品简介

1.1 产品概述

大质粒中量提取试剂盒采用改良碱裂解法结合离子交换层析，专为常规硅胶膜 (silica membrane) 离心柱难以胜任的大分子量质粒设计。硅胶膜法受膜孔径与吸附动力学限制，对 >20 kb 的质粒回收率显著下降，且离心过程中的剪切力容易造成超螺旋 (supercoiled, ccc) 构象向开环 (open circular, oc) 甚至线性 (linear) 转变。本试剂盒以开放柱床、重力流核心，全流程避免高剪切操作，可在保持大质粒完整性的前提下获得可直接用于酶切、测序、电转化与转染的 DNA。

1.2 产品特点

特点	说明
无孔径排阻限制	开放式树脂柱床不存在膜孔径截留问题，对 BAC/PAC 等 >100 kb 构建体同样适用
低剪切全流程	重力流上样、宽口枪头、无涡旋操作规范，最大限度保留超螺旋构象
低 EDTA 洗脱	层析缓冲液 EDTA 降至 1 mM，避免高浓度 EDTA 随洗脱液带入终产物而抑制下游酶反应与转染
可线性放大	同一化学体系适用于 Midi (150 mL) 至 Maxi (300 mL) 及更大培养规模，便于工艺转移

1.3 适用范围

	内容
适用	15–50 kb 大质粒；Cosmid / Fosmid (35–45 kb)；Bacmid / BAC / PAC (50–300 kb)；p15A、pSC101、oriV 等低拷贝复制子质粒；需保持高超螺旋比例的电转化与转染用样本

2 产品信息

规格与货号

产品	规格	提取次数	货号
大质粒中量提取试剂盒	S	5 T (5 次)	EVK3212S
大质粒中量提取试剂盒	M	10 T (10 次)	EVK3212M
大质粒中量提取试剂盒	L	25 T (25 次)	EVK3212L



组分、装量与储存

组分	货号	S (5 T)	M (10 T)	L (25 T)	储存温度
P1	/	50 mL	100 mL	250 mL	2–8 °C (加入 RNase A 后)
RNase A	GR5013	0.5 mL	1 mL	2.5 mL	–20 °C
P2	/	50 mL	100 mL	250 mL	室温 15–25 °C
P3	/	50 mL	100 mL	250 mL	室温或 2–8 °C
Dilution Buffer	/	250 mL	500 mL	1250 mL	室温
Equilibration/Wash Buffer	/	400 mL	800 mL	2000 mL	室温
Elution Buffer	/	75 mL	150 mL	375 mL	室温
纯化柱	CO1301	5 mL×5 支	5 mL×10 支	5 mL×25 支	2–8 °C (严禁冻存)
TE	—	3 mL	5 mL	15 mL	2–8 °C
产品说明书	—	1 份	1 份	1 份	—

△ NovaBac™ 层析柱严禁冷冻：纤维素基质在冻融过程中会发生不可逆的溶胀塌陷与颗粒破碎，导致柱床压实、流速骤降及载量永久性损失。收到货后请立即将树脂转移至 2–8 °C 保存，切勿置于 –20 °C。

2.1 用户自备材料与设备

- LB 液体培养基及相应抗生素；37 °C 恒温摇床
- 高速冷冻离心机（可达 12,000 × g，配 50 mL 或 250 mL 转子）
- 异丙醇 (isopropanol)、70% 乙醇（分子生物学级）
- TE 缓冲液 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA) 或无核酸酶水
- 宽口枪头或剪去尖端的常规枪头——大质粒操作必备
- 层析支架、废液收集容器、蠕动泵（可选，用于控制流速）
- 紫外分光光度计或微量核酸定量仪；琼脂糖凝胶电泳系统

2.2 运输与储存

试剂盒常温运输（树脂组分冰袋运输）。收到后按第 2 节表格分装保存。未开封条件下，除 RNase A 外各组分自生产之日起有效期 12 个月；RNase A 于 –20 °C 保存有效期 24 个月。P1 中加入 RNase A 后于 2–8 °C 保存，有效期 6 个月。

3 实验流程概览

完整流程约 4–5 小时（不含过夜培养）。带 ★ 标记者为大质粒关键控制点。

阶段	步骤	操作要点	预计耗时
A 上游	1. 菌体培养 2. 离心收集	低拷贝质粒/BAC 需延长培养至 16–20 h	过夜 + 20 min
B 裂解	3. P1 4. ★ P2 碱裂解 5. P3 中和 6. 澄清	★ 全程温和颠倒混匀，严禁涡旋；碱裂解 ≤ 3 min	50 min
C ★ 调节	7. ★ Dilution Buffer	★ 将上样液电导率降低，否则 DNA 不结合	10 min
D 纯化	8. 柱平衡 9. 上样 10. 漂洗 11. ★ 洗脱	★ 洗脱液 Elution Buffer 预热至 50 °C；重力流，勿加压	90 min
E 回收	12. 异丙醇沉淀 13. 70% 乙醇洗涤 14. 复溶	室温沉淀；干燥 ≤ 10 min；4 °C 静置复溶	60 min
F QC	15. 定量与鉴定	A260/A280、限制性酶切、低电压电泳或 PFGE	按需

4 使用前准备

- 4.1 向 P1 中加入配套 RNase A（10 mg/mL，按每 100 mL P1 加入 1 mL）混匀，标注加入日期，2–8 °C 保存。RNase A 处理为强制步骤，不可省略。
- 4.2 检查 P2 是否析出 SDS 沉淀。低温储存时 SDS 可能结晶，使用前置 37 °C 水浴至完全澄清并冷却至室温。P2 一旦开封应密封保存，长期暴露空气会因吸收 CO₂ 而降低 NaOH 有效浓度，导致裂解不完全。
- 4.3 P3 建议提前置于 2–8 °C 预冷。中和步骤在低温下进行可显著提高基因组 DNA (gDNA) 与蛋白-SDS 复合物的沉淀效率。
- 4.4 ★ 将洗脱缓冲液 Elution Buffer 置于 50 °C 水浴预热，于使用前保持温度。此步骤对 >50 kb 构建体的得率影响可达 2 倍以上。
- 4.5 准备宽口枪头。将常规 1000 μL 枪头用洁净剪刀剪去前端约 3–5 mm，或直接使用商品化宽口枪头。所有涉及含质粒 DNA 溶液的移液操作均应使用宽口枪头。

▲ ★ 大质粒操作的三条铁律：

- ① 全程禁止涡旋 (vortexing)。仅使用温和颠倒混匀 (gentle inversion)，每次颠倒约 2 秒完成。涡旋产生的流体剪切足以将 >50 kb DNA 打断。
- ② 全程使用宽口枪头。普通枪头尖端的高速通过区是大质粒断裂的主要发生位点。
- ③ 避免反复冻融与剧烈重悬。终产物建议 4 °C 短期保存或 –20 °C 单次分装冻存。



5 操作步骤

以下步骤以 Midi 规格（150 mL 培养体积）为标准描述。S / M / L 三种规格的单次操作体积完全一致，仅提取次数与试剂装量不同。

5.1 菌体培养与收集

1. 挑取单菌落接种于 5 mL 含相应抗生素的 LB 培养基，37 °C、220 rpm 培养 8 h 或过夜作为种子液。
2. 按 1:500 接种至 150 mL 含抗生素的 LB 培养基。培养条件按载体类型选择：

载体类型	培养温度	培养时间	建议 OD ₆₀₀
高拷贝大质粒 (pUC ori, 15–30 kb)	37 °C	12–14 h	3.0–4.0
低拷贝质粒 (p15A / pSC101)	37 °C	16–18 h	2.5–3.5
Bacmid / BAC / PAC / Fosmid	37 °C	16–20 h	2.0–3.0
oriV 诱导型 Fosmid/BAC	37 °C	培养至 OD ₆₀₀ 0.6 后加诱导剂再培养 5 h	1.5–2.5

▲ 切勿过度培养：培养超过 20 h 会造成菌体自溶、gDNA 与内毒素释放增加，同时质粒受核酸酶降解。低拷贝载体延长培养的收益在 18 h 后即趋于饱和，而杂质负荷持续上升。

3. 4 °C、6,000 × g 离心 5 min 收集菌体。彻底弃去上清（可将离心管倒置于吸水纸上 1 min），残留培养基会稀释 P1 并干扰后续裂解。
4. 菌体沉淀可立即使用，或 -20 °C 冻存不超过 1 个月。冻存菌体解冻时置于冰上自然融化。

5.2 碱裂解与澄清

1. 加入 8 mL P1（已含 RNase A），用宽口枪头反复吹打或温和涡旋菌体沉淀至完全重悬，不得残留菌块。

① 此处是全流程唯一允许涡旋的步骤：在 P2 加入之前，细胞尚未破裂，质粒仍受细胞壁保护，此时涡旋重悬菌体不会造成 DNA 剪切。自 5.2.2 起，所有混匀操作一律改为温和颠倒。

2. ★ 加入 8 mL P2 立即温和颠倒混匀 4–6 次，至溶液变为清亮黏稠。室温静置不超过 3 min（常规质粒方案通常为 5 min；大质粒缩短至 3 min 以降低不可逆变性与断裂风险）。
3. 加入 8 mL 预冷 P3，立即温和颠倒混匀 6–8 次，至形成均匀白色絮状沉淀。混匀必须迅速彻底——局部残留的碱性微环境会使已释放的大质粒不可逆变性。
4. 冰浴静置 15 min。此期间 SDS-钾盐复合物、蛋白质与 gDNA 充分絮凝。
5. 4 °C、12,000 × g 离心 20 min。若上清仍显浑浊，重复离心 10 min。

6. 若上清仍有白色物质，则将上清经 2 层无菌纱布或折叠滤纸重力过滤。
7. 加入 1.5 倍体积的 Dilution Buffer（约 36 mL），温和颠倒混匀。

5.3 纯化柱纯化

1. 将 25–40 mL 的 Equilibration/Wash Buffer 加入纯化柱使其平衡，流速控制在 1–2 mL/min（重力流通常即在此范围内）。
2. 将上述稀释好的上样液沿柱壁缓慢加入，切勿冲击柱床表面。全程重力流出。
3. （推荐）收集流穿液 (flow-through) 并保留至实验结束。若最终得率异常，检测流穿液 A_{260} 可直接判定是否为「未结合」故障——这是排查大质粒纯化失败最有价值的单一诊断信息。
4. 用 25–40 mL 的 Equilibration/Wash Buffer 洗柱，去除蛋白质、多糖与松散结合杂质。

★ 洗脱

5. 用 15 mL 预热至 50 °C 的 Elution Buffer 洗脱。分管收集，每管 1 mL。
6. 取各管 2 μ L 测定 A_{260} ，合并含 DNA 的高峰管。大质粒的洗脱峰通常较常规质粒略宽、峰位略靠后，属正常现象。

5.4 沉淀、洗涤与复溶

1. 向合并的洗脱液中加入 0.7 倍体积室温异丙醇，温和颠倒混匀 10 次。
2. ★ 室温静置 10 min 后立即离心。请勿置于 -20 °C 低温沉淀。
3. 4 °C、 $\geq 12,000 \times g$ 离心 30 min。大质粒沉淀常呈半透明胶状而非致密白点，弃上清时须格外小心，建议移液而非倾倒。
4. 加入 8 mL 室温 70% 乙醇，轻轻旋转洗涤（勿重悬沉淀），4 °C、 $\geq 12,000 \times g$ 离心 10 min。
5. 弃乙醇，室温风干 5–10 min。切勿过度干燥——完全干燥的大质粒沉淀极难复溶，且强行吹打复溶会造成断裂。沉淀边缘刚由白色转为半透明即应停止干燥。
6. 加入 200–500 μ L TE 缓冲液或无核酸酶水，4 °C 静置过夜复溶，其间可温和弹管数次。切勿涡旋或反复吹打。Bacmid / BAC/PAC 样本建议复溶体积不低于 200 μ L 以避免局部浓度过高造成的黏度问题。

▲ **溶剂选择：**长期保存建议使用 TE (pH 8.0)，其中 0.1 mM EDTA 可螯合微量二价金属离子、抑制残余核酸酶活性。若下游为电转化 (electroporation)，须改用无核酸酶水或经脱盐处理，否则 TE 中的盐分会导致电击杯打火。

6 大质粒的结果鉴定建议

常规 0.8% 琼脂糖凝胶、5 V/cm 的电泳条件无法分辨 >20 kb 的 DNA，所有大分子量条带都会压缩堆积在孔附近，因此不能据此判断质粒完整性或大小。请按下表选择合适的鉴定手段。

构建体大小	推荐鉴定方法	关键参数
15–25 kb	常规琼脂糖凝胶电泳	0.6–0.7% 胶, 1.5–2 V/cm, 过夜 12–16 h, 4 °C
25–50 kb	低浓度低电压电泳 + 限制性酶切	0.5–0.6% 胶, 1 V/cm, 16–20 h; 酶切产生 2–10 kb 片段后常规电泳判读
50–300 kb (Bacmid/BAC/PAC)	★ 脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 为金标准	1% 胶, CHEF 系统, 切换时间 1–15 s, 6 V/cm, 14 °C, 18–20 h
任意大小 (结构确认)	限制性酶切指纹 (fingerprinting)	选择产生 5–20 个可分辨片段的多切点酶; 这是判断插入片段是否发生重组丢失最实用的方法
任意大小 (完整性)	Nanopore 长读长测序	可同时确认序列与拓扑结构, 适用于关键构建体放行

▲ **限制性酶切前的必要处理:** 本流程终产物含 1 mM EDTA (TE 复溶后约 0.1 mM)。多数限制性内切酶在此浓度下不受影响, 但对 Mg^{2+} 需求较高的酶 (如部分 Type IIS 酶) 建议将模板量控制在反应体系的 1/10 体积以内, 或先行乙醇沉淀脱盐。

7 常见问题排查

现象	可能原因	解决方案
得率极低或完全无产物 (最常见)	★ 上样液离子强度高, DNA 未结合填料	检测流穿液 A_{260} 即可确诊。补足 Dilution Buffer 稀释倍数
得率偏低 (约为预期 30–60%)	洗脱不完全: 盐浓度或温度不足	确认 Elution Buffer 已预热至 50 °C; 增加洗脱体积至 4 CV 并延长每份接触时间
得率偏低	低拷贝载体培养不足	延长培养至 18 h; 使用 2×YT 或 TB 培养基; 对 oriV 型载体使用拷贝数诱导
凝胶显示条带弥散、无清晰主带	★ 机械剪切	全面复核「三条铁律」; 重点检查是否使用了涡旋、普通枪头或注射器过滤
高分子量弥散背景 (gDNA 污染)	碱裂解过度或混匀剧烈	P2 静置严格 ≤ 3 min; P3 加入后混匀动作放缓但须彻底; 澄清离心延长至 30 min
凝胶底部出现弥散低分子量带	RNA 残留	确认 P1 已加入 RNase A 且未超期; 检查 RNase A 是否经反复冻融失活; 增加 Equilibration/Wash Buffer 漂洗至 5 CV
$A_{260}/A_{280} < 1.70$	蛋白残留, 漂洗 I 不足	将 Equilibration/Wash Buffer 漂洗增至 8–10 CV, 并监测 A_{280} 至确实回落基线后再洗脱
$A_{260}/A_{230} < 1.8$	盐或异丙醇残留	确认异丙醇沉淀在室温进行; 增加 70% 乙醇洗涤至 2 次; 延长风干至 10 min (但不可完全干透)
柱流速极慢或完全堵塞	澄清不彻底 / 树脂被冻存过	延长澄清离心并增加重力过滤; 确认树脂从未经历冻融

现象	可能原因	解决方案
沉淀无法复溶	过度干燥	加入 TE 后 50 °C 温浴 10 min，随后 4 °C 静置过夜；切勿吹打或涡旋
酶切结果与图谱不符 / 片段缺失	插入片段在宿主中发生重组	改用 $recA^- / sbcC^-$ 重组缺陷宿主（如 EPI300、DH10B）；降低培养温度至 30 °C